

## イソプレノイド化合物の膜間移動に関する研究

著者	小関 弘恵知
号	50
学位授与番号	2331
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/39390">http://hdl.handle.net/10097/39390</a>

氏名・(本籍)	こ せき こう い ち 小 関 弘恵知
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理博第2331号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)化学専攻
学位論文題目	イソプレノイド化合物の膜間移動に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 古 山 種 俊 教授 十 川 和 博, 清 水 透 助教授 佐 上 博

## 論 文 目 次

### 序章

#### 第1章 蛍光標識ポリプレニルリン酸誘導体の合成

##### 第1節 蛍光発色団の選択と合成スキームの構築

##### 第2節 NBD標識ポリプレニルリン酸誘導体の合成

##### 第3節 第1章 考察

##### 第4節 実験方法

#### 第2章 ポリプレニルリン酸フリップフロップのアッセイ法の構築

##### 第1節 リボソームにおけるNBD標識ポリプレニルリン酸誘導体の定量性

##### 第2節 ジチオナイト蛍光消光法によるアッセイ法の構築

##### 第3節 本アッセイ法の応用

##### 第4節 第2章 考察

##### 第5節 実験方法

### 第3章 総括

### 参考文献

### 謝辞

## 論 文 内 容 要 旨

### 序

天然にはイソプレノイドまたはテルペノイドと呼ばれる炭素数5 ( $C_5$ ) のイソプレン単位を基本骨格に持つ天然有機化合物群が存在する。これらの化合物群は活性イソプレン単位であるイソペンテニル二リン酸 (IPP) とその異性体であるジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) との縮合反応によりその炭素骨格が形成され、それに引き続く環化, および転位などの諸反応を経て生合成される。その化合物群の中でも, 特にIPPがシス型に縮合したポリプレニル鎖を持つウンデカプレニル二リン酸やドリキル二リン酸はその

ポリプレニル鎖の疎水性が活かされ糖担体脂質、いわゆる膜アンカー脂質として機能している。例えばペプチドグリカン (PG) 生合成前駆体 Lipid II はウンデカプレニル基がその担体脂質として担っている。この前駆体は細胞質内で生合成されたのち細胞質側からペリプラズム側 (脂質二重膜の内層から外層) に移行してPGの構築に用いられる。その後ウンデカプレニルリン酸が遊離され、これはペリプラズム側から細胞質側 (脂質二重膜の外層から内層) に戻ることで再び細胞質内の前駆体生合成の担体脂質として利用されることが長い間想定されてきた (図1)。

このウンデカプレニルリン酸の膜内における挙動、すなわちフリップフロップ (flip-flop) 過程を調べるにはそれを解析するためのアッセイ法が必要である。しかしそのフリップフロップを解析するためのプローブが現在まで存在しておらず、故にこのフリップフロップを解析するための方法論も確立していない。そこで本研究は、ウンデカプレニルリン酸を含めたポリプレニルリン酸のフリップフロップを解析するための蛍光プローブの合成を行い、合成した蛍光プローブを用いてポリプレニルリン酸フリップフロップのアッセイ法を構築することを目的とした。

## 第1章 蛍光標識ポリプレニルリン酸誘導体の合成

### 第1節 蛍光発色団の選択と合成スキームの構築

蛍光発色団には7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) 基を選択した。最大の利点はこの蛍光団を還元処理することで蛍光を消光させることが出来ることである。原料のウンデカプレノールは合成的に入手することは困難であるため、蚕の糞より抽出精製したものを合成に用いた。また蛍光プローブ**1a-c** (図2) の合成を達成すべく、合成スキームを構築するにあたり (1)  $\alpha$  位の二重結合にリン酸基があるため酸性条件に弱いこと、(2) ポリプレニル基に見られる様な多数の二重結合が存在すること、以上の点を考慮しNBD化、リン酸ジエステル化の順序が異なる3つの合成スキームを立案した。

### 第2節 NBD標識ポリプレニルリン酸誘導体の合成

3つの合成スキームのうち以下に示す合成スキームで目的物の合成を達成した (Scheme 1)。

まずポリプレノール**2a-c**をトリクロロアセチミデート**8a-c**に変換した。次にリン酸二水素2-アミノエチル**3**のアミノ基をBoc保護した化合物**9**と**8a-c**とをカップリングさせホスホジエステル体**11a-c**を得た。続けて脱Boc化によりアミノ体**12b,c**を得た。しかし**12a**は得られなかった。そこで**3**のアミノ基の保護基をFmoc基にした化合物**10**を用いて**2a**とカップリング後脱Fmoc化を行ったところ目的の**12a**を得た。最後に**12a-c**のアミノ基にNBD基を導入することで目的の蛍光アナログ**1a** (全収率9%), **1b** (全収率3%), **1c** (全収率2%) を得た (以下では合成したNBD誘導体を蛍光プローブと記した)。

## 第2章 ポリプレニルリン酸フリップフロップのアッセイ法の構築

### 第1節 リポソームにおけるNBD標識ポリプレニルリン酸誘導体の定量性

合成した蛍光プローブ**1a-c**と卵黄ホスファチジルコリンを用いて、蛍光プローブ含有リポソームを凍結融解・押し出し法 (freeze-thawing/extrusion) によって調製し、吸光光度計による吸光度測定および蛍光光度計による蛍光強度の測定を行った。その結果、リポソームに含有する蛍光プローブ濃度依存的な吸光度および蛍光強度の増加が示された。つまり合成した蛍光プローブ**1a-c**がリポソーム中で定量的に扱えることが明らかとなった。

### 第2節 ジチオナイト蛍光消光法によるアッセイ法の構築

調製した蛍光プローブ含有リポソームをジチオナイト ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) 処理し蛍光プローブの蛍光消光の挙動を調べた。その結果ジチオナイト処理後一定時間経過すると蛍光強度が約半分の値を示し、それ以降

その蛍光強度値が大きく変化しないプラトー域が認められた（図3）。さらに界面活性剤Triton X-100を用いて二重膜構造を破壊することで全蛍光を消光出来た。この結果より、**1a-c**がリポソームの脂質二重膜の内層、外層に概ね均等に分布することが示唆された。すなわち、フリップフロップの程度を蛍光強度の変化量から導き出せる画期的な、**1a-c**を用いたアッセイ法を構築出来た。

一方、ジチオナイト処理直後の蛍光強度減少の挙動（蛍光強度曲線の立下り）が3つの蛍光プローブ間で異なること、すなわちプレニル鎖が長くなるに従い蛍光強度減少が緩やかになることを明らかにした。これは蛍光プローブ中のプレニル鎖の長さが蛍光消光に影響を与えているものと考えた。さらにこの現象は大腸菌リン脂質で調製した蛍光プローブ含有リポソームで顕著になったことより、リポソームを構成するリン脂質が蛍光強度減少の挙動に影響を与えることも考えられた。そこで、異なるリン脂質組成（PC, PE, PG, CL）を持つ蛍光プローブ含有リポソームを調製し、ジチオナイト蛍光消光による蛍光プローブの蛍光消光の挙動を調べた。その結果リポソームのリン脂質組成がPCから大腸菌リン脂質（PE:PG:CL=8:1.5:0.5）になるに従い、特に蛍光プローブが**1a**の場合、ジチオナイト処理後の蛍光強度減少の挙動がプラトー域の生じる状態から指数関数的な単純減少を示すことを明らかにした。

このような変化を示す理由として以下のことが考えられる。プレニル鎖がリン脂質のアシル鎖とほぼ等しい**1b**, **1c**は蛍光プローブのホスホジエステル部分がリン脂質の頭部と同じ位置にあり、ジチオナイトの還元作用を受けやすい環境にあると考えられる。そのため蛍光強度減少が速やか、すなわち立下りが急になったと考えられる。これに対してプレニル鎖が長いウンデカプレニル基を有する**1a**はウンデカプレニル基とリン脂質のアシル鎖との疎水性相互作用により脂質二重膜の内部に引き込まれ、このホスホジエステル部分がリン脂質の頭部より膜内部の方に位置し、ジチオナイトの還元作用を受けにくい環境に置かれていると考えられる。そのため蛍光強度減少が緩やか、すなわち立下りがゆっくりになったと考えられる。

### 第3節 本アッセイ法の応用

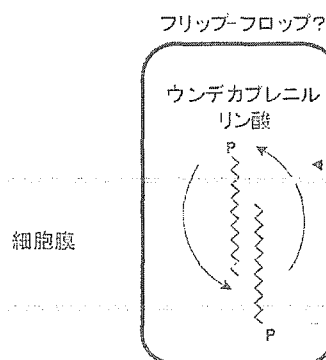
ウンデカプレニルリン酸のフリップフロップはタンパク質を介した現象であると考えられている。そこで実際にタンパク質を特定する際に使用するタンパクサンプルで蛍光プローブを用い、蛍光プローブの有用性を評価した。プロトコル系は①大腸菌内膜成分と、②大腸菌由来タンパク質をカラムクロマトグラフィーにて分画し、得られたタンパク画分を用いて調製した再構成膜（プロテオリポソーム）の、2つの系を用いた。各タンパクサンプルに蛍光プローブを添加してインキュベーション後、蛍光プローブの膜への取り込みおよびジチオナイト蛍光消光による蛍光プローブの蛍光消光の挙動を調べた。その結果2つのプロトコル系とも、蛍光プローブの膜への取り込みはProteinase K処理・未処理で蛍光プローブ、特に**1a**の取り込みに差が認められた。これは**1a**の膜への取り込みにタンパク質の関与が考えられ、本研究で合成した蛍光プローブを用いて初めて得られた結果であった。以上より本研究で合成した蛍光プローブの有用性が示された。

### 総括

蚕の糞より抽出精製したウンデカプレノールを含むプレノールを用いてポリプレニルリン酸のフリップフロップを解析するための蛍光プローブ3種の合成に成功した。また合成した蛍光プローブを含むリポソームを用いた、ポリプレニルリン酸のフリップフロップを解析するアッセイ法を構築出来た。今後、本研究で確立したアッセイ法を利用することで、詳細なウンデカプレニルリン酸のフリップフロップ過程の解明のみならず、この過程を触媒する新規タンパク質の発見やウンデカプレニルリン酸の新規生理機能の発見などに繋がることが期待される。

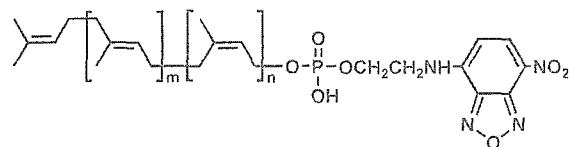
～ペリプラズム～

ペプチドグリカン



～細胞質～

Lipid II



m=3, n=7 (Undecaprenyl) : C<sub>55</sub>-P-NBD 1a

m=3, n=0 (Geranylgeranyl) : C<sub>20</sub>-P-NBD 1b

m=2, n=0 (Farnesyl) : C<sub>15</sub>-P-NBD 1c

図2 蛍光プローブ 1a-c

図1 ウンデカプレニルリン酸のフリップフロップ

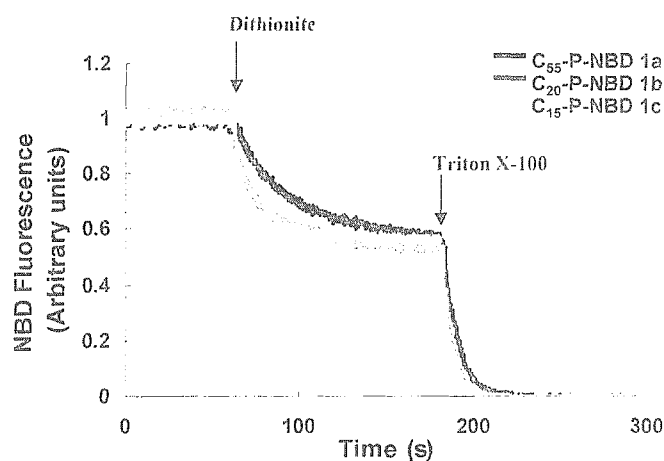
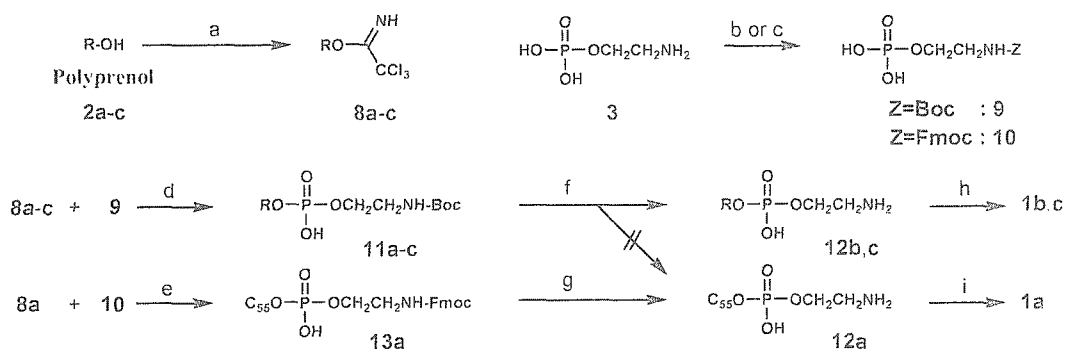


図3 蛍光プローブ含有リボソームのジチオナイト蛍光消光



Reagents and conditions: (a) Cl<sub>3</sub>CCN, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 9 h; (b) Boc<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxane:H<sub>2</sub>O (1:1), 0 °C→rt, 17 h; (c) Fmoc-OSu, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxane:H<sub>2</sub>O (3:2), rt, 1 h; (d) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 3 h; (e) 1,4-Dioxane, rt, 15 min; (f) 50% NaOH, 1,4-Dioxane, reflux, 1 h; (g) Piperidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 5 min; (h) NBD-Cl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxane:H<sub>2</sub>O (1:1), rt, 20 h; (i) NBD-Cl, Et<sub>3</sub>N, CHCl<sub>3</sub>, rt, 2 h.

Scheme 1

## 論文審査の結果の要旨

細菌の細胞壁生合成や真核生物の小胞体での糖タンパク質生合成において、オリゴ糖鎖の糖キャリア脂質として働く、ウンデカプレニルリン酸やドリコールリン酸等のポリプレニルリン酸の生体膜間フリップ-フロップ反転輸送によるリサイクル機構は細菌の細胞分裂の速度や高等生物における糖タンパク質の効率的分泌量の維持などを考慮すると生命現象に不可欠であると考えられるが、未だその機構についてはその存在すら確証が得られていない状態である。本研究はこの反転輸送機構が「フリッパーゼ」と総称される酵素によって触媒されることを立証し、その分子レベルでの解明研究の手がかりを得ることを目的として、蛍光標識した細菌の糖キャリア脂質プローブを合成し、それを用いた生体膜間の動的な反転輸送過程を直接アッセイする系の確立を行ったものである。

著者はまず、蛍光発色団に7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) 基を選択し、蚕の糞より抽出したウンデカプレノールを含む3種類のプレノールのリン酸エステルとNBDをリンカーで結合した3種類のプローブの合成に成功した。次に、これらのプローブとホスファチジルコリンとで調製したリポソームを用いて、ジチオナイト ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) による蛍光プローブの蛍光消光の挙動を調べた結果、ジチオナイト処理後一定時間経過すると蛍光強度が約半分の値を示し、それ以降その蛍光強度値が大きく変化しないプラトー域が認められた。さらに界面活性剤Triton X-100を用いて二重膜構造を破壊することで全蛍光を消光出来た。このことは、ポリプレニルリン酸がフリップフロップによってリサイクルされる量を蛍光強度の変化量から導き出す新規なアッセイ法を構築することが出来たことを意味する。実際に細菌の細胞膜タンパク試料で蛍光プローブと共にプロテオリポソームを調製し、蛍光プローブの有用性を評価した結果、蛍光プローブの内膜側への取り込みはプロテアーゼ処理・未処理で有意な差が認められた。このことより、生体膜間のフリップ-フロップ量を測定するアッセイ系として、本研究で開発した蛍光プローブが有効であることが示された。

本研究は著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、小関弘恵知提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。